

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> : C07D 493/04, C12P 17/18 A01N 43/90, A61K 31/425 // (C07D 493/04, 313:00, 303:00) (C12P 17/18, C12R 1:00)	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/10121  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Mai 1993 (27.05.93)
--	----	---

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02656

(22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1992 (19.11.92)

(30) Prioritätsdaten: P 41 38 042.8 19. November 1991 (19.11.91) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten außer US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) (DE/DE); Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE). CIBA-GEIGY AG (CH/CH); Klybeckstr. 141, CH-4002 Basel (CH).

(72) Erfinder; und  
 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÖFLE, Gerhard (DE/DE); BEDORF, Norbert (DE/DE); GERTH, Klaus (DE/DE); REICHENBACH, Hans (DE/DE); Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).

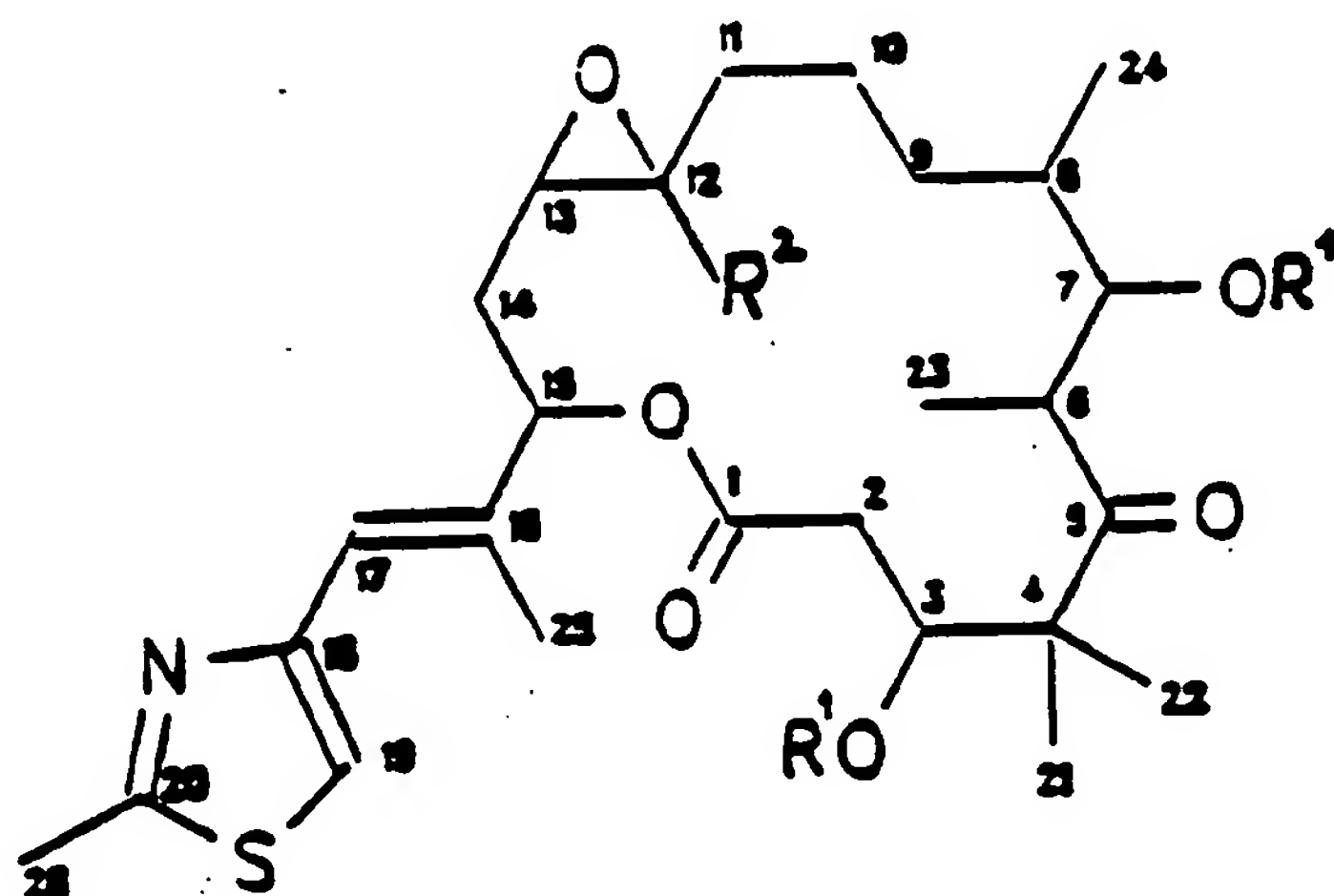
(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Bereiteranger 15, D-8000 München 90 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).

Veröffentlicht  
 Mit internationalem Recherchenbericht

(54) Title: EPOTHILONES, PROCESS FOR PREPARING THE SAME AND THEIR USE AS MEDICAMENTS AND AS PLANT PROTECTING AGENTS

(54) Bezeichnung: EPOTHILONE, DEREN HERSTELLUNGSVERFAHREN UND IHRE VERWENDUNG ALS ARZNEIMITTEL UND PFLANZENSCHÜTZENDE MITTEL



(57) Abstract

Epothilones having general formula (I), a process for preparing the same and epothilone-containing agents are disclosed.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Epothilone der allgemeinen Formel (I). Herstellungsverfahren sowie Epothilone enthaltende Mittel.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlichen.

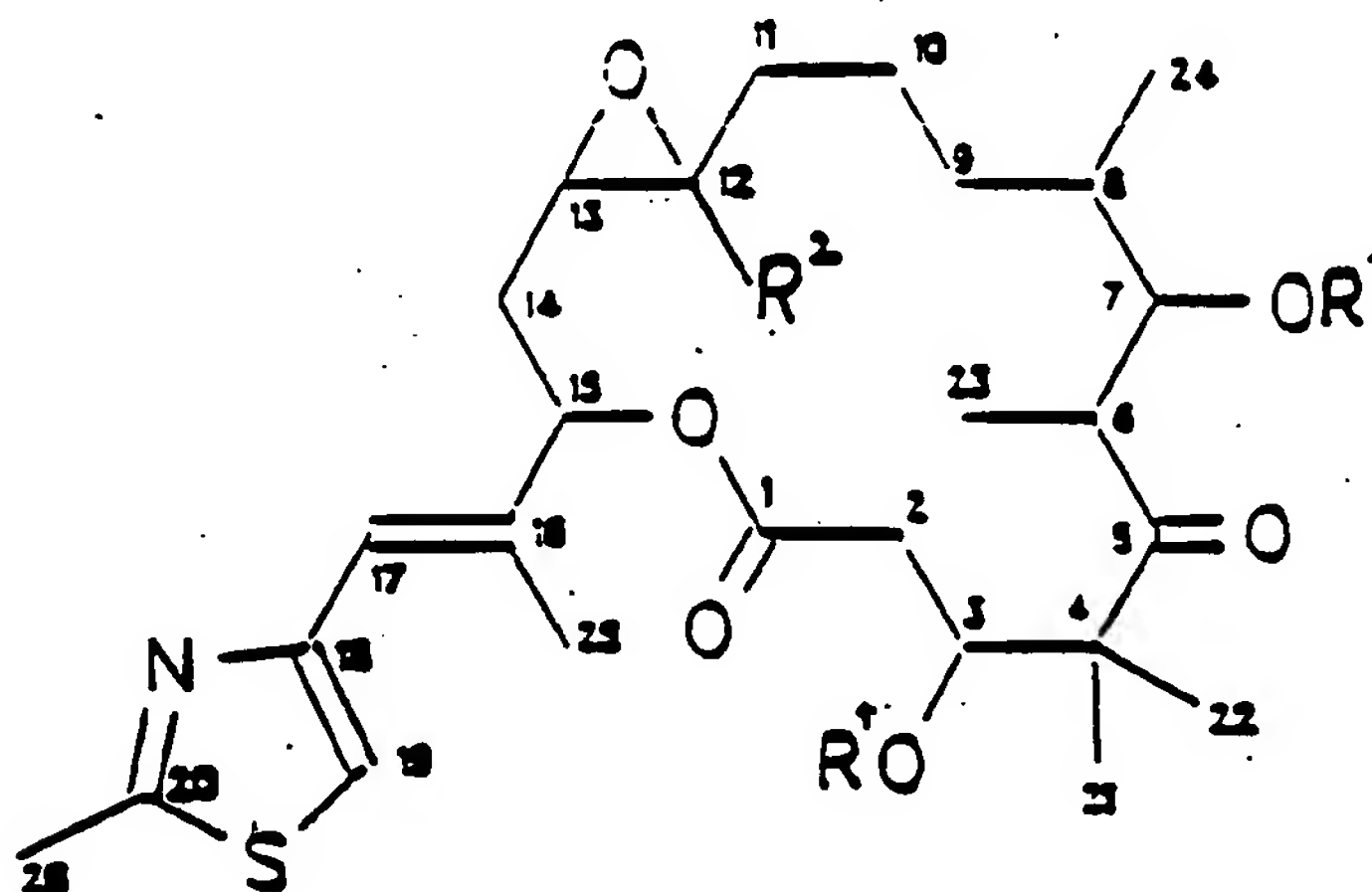
AT Österreich  
 AU Australien  
 BE Belgien  
 BG Bulgarien  
 BR Brasilien  
 BU Brasilien  
 CA Kanada  
 CH Schweizer Eidgenossenschaft  
 CL Chile  
 CN Volksrepublik China  
 CO Kolumbien  
 CZ Tschechien  
 DE Deutschland  
 DK Dänemark  
 ES Spanien  
 FI Finnland

FR Frankreich  
 GA Gabun  
 GB Vereinigtes Königreich  
 GR Griechenland  
 HU Ungarn  
 IE Irland  
 IT Italien  
 JP Japan  
 KP Demokratische Volksrepublik Korea  
 KR Republik Korea  
 KU Kuwait  
 LI Liechtenstein  
 LU Luxemburg  
 MC Monaco  
 MG Madagaskar  
 ML Mali  
 MN Mongolei

MR Mauritien  
 MW Malawi  
 NL Niederlande  
 NO Norwegen  
 NZ Neuseeland  
 PL Polen  
 PT Portugal  
 RO Rumänien  
 RU Russische Föderation  
 SD Sudan  
 SE Schweden  
 SI Slowenische Republik  
 SN Senegal  
 SU Sowjet Union  
 TD Tunesien  
 TG Togo  
 UA Ukraine  
 US Vereinigte Staaten von Amerika  
 VN Vietnam

# EPOTHILONE, DEREN HERSTELLUNGSVERFAHREN UND IHRE VERWENDUNG ALS ARZNEIMITTEL UND PFLANZENSCHÜTZENDE MITTEL

Die Erfindung betrifft Epothilone der folgenden allgemeinen Formel:



worin  $R^1$  Wasserstoff,  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl,  $C_1$ - $C_4$ -Alkanoyl,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $1/2 Mg^{2+}$  oder  $1/2 Ca^{2+}$  bedeutet und  $R^2$  Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

Ferner betrifft die Erfindung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

<sup>1</sup> H-NMR-Daten			<sup>13</sup> C-NMR-Daten	
Atom			Atom	
2a	2,4	dd	1	170,5
2b	2,52	dd	2	39,1
3	4,19	dd	3	73,2
6	3,2	m	4	53,0
7	3,78	dd	5	219,9
8	1,73	m	6	43,5
9a	1,4	m	7	74,7
9b	1,52	m	8	36,4
10a	1,4	m	9	30,7
10b	1,4	m	10	23,6
11a	1,42	m	11	27,6
11b	1,7	m	12	57,4
12	2,9	ddd	13	54,6
13	3,01	ddd	14	31,7
14a	1,85	ddd	15	76,8
14b	2,11	ddd	16	137,4
15	5,41	dd	17	120,1
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,3
21*	1,08	s	20	165,0
22*	1,35	s	21*	20,4
23	1,15	d	22*	21,6
24	0,93	d	23	14,1
25	2,05	s	24	17,1
26	2,69	s	25	15,6
			26	19,1

\*) Zuordnung vertauschbar

$C_{26}H_{39}NO_6S$  [493]

FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für  $(M - H)^-$

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

$\nu$ : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979  $cm^{-1}$

DC:  $R_F$  = 0,75

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120 °C,  
braune Anfärbung

HPLC:  $R_t$  = 5,4 min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu m$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Des weiteren betrifft die Erfindung ein Epothilon, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:

<sup>1</sup> H-NMR-Daten			<sup>13</sup> C-NMR-Daten	
Atom			Atom	
2a	2,22	dd	1	170,5
2b	2,53	dd	2	39,4
3	4,24	dd	3	72,9
6	3,28	m	4	53,2
7	3,75	dd	5	219,8
8	1,73	m	6	43,1
9a	1,4	m	7	74,3
9b	1,5	m	8	36,6
10a	1,4	m	9	30,9
10b	1,4	m	10	22,5
11a	1,42	m	11	32,3
11b	1,7	m	12	61,3
12	-		13	61,7
13	2,8	dd	14	32,4
14a	1,9	ddd	15	76,9
14b	2,1	ddd	16	137,5
15	5,41	dd	17	120,0
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,2
21*	1,05	s	20	165,1
22*	1,36	s	21*	19,7
23	1,15	d	22*	21,5
24	0,92	d	23	13,7
25	2,05	s	24	17,2
26	2,69	s	25	15,7
27	1,28	s	26	19,0 (R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> )

\*) Zuordnung vertauschbar

$C_{27}H_{41}NO_6S$  [507]

FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für  $(M - H)^-$

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

$\nu$  = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977  $cm^{-1}$

DC:  $R_F$  = 0,75

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120 °C,  
braune Anfärbung

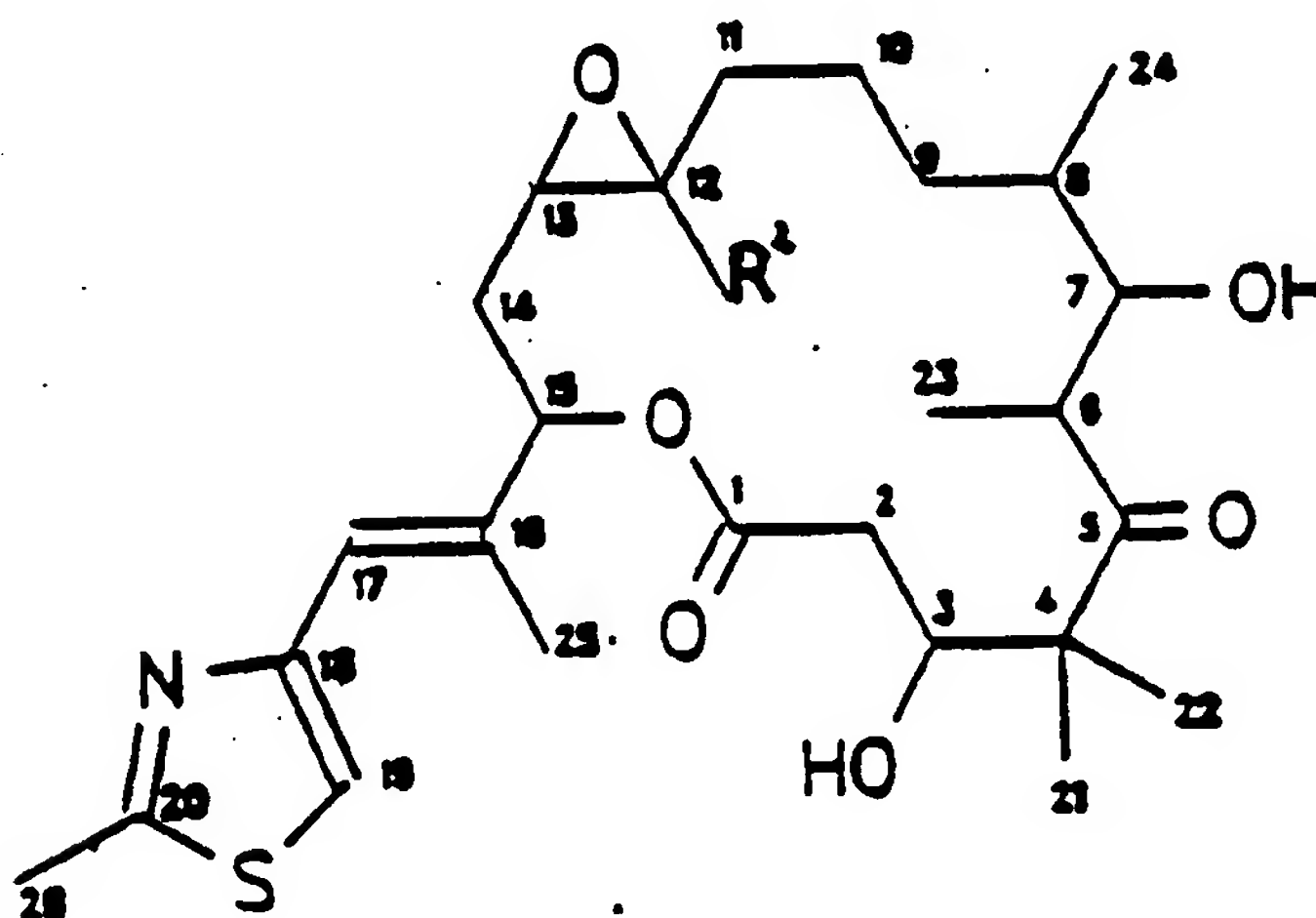
HPLC:  $R_t$  = 6,3 min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu m$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

Besonders bevorzugt sind Epothilone mit der folgenden Strukturformel:



worin R<sup>2</sup> Wasserstoff oder Methyl bedeutet. (Das Kohlenstoffatom der Methylgruppe wird als C27 bezeichnet). Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Gewinnen von Epothilonen, insbesondere der vorstehend charakterisierten Epothilone, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man den Stamm So ce90 DSM 6773

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorberharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorberharz eluiert und
- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreingt und voneinander trennt.

Gegebenenfalls können die so gewonnenen Epothilone mit gängigen chemischen Verfahren weiter umgesetzt werden, z.B. mit Basen in die Alkali- und Erdalkalisalze überführt und gegebenenfalls weiter zu Ethern umgesetzt werden, oder sie können mit organischen Säuren in die entsprechenden Ester überführt werden.

Ferner betrifft die Erfindung ein Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).



Schließlich betrifft die Erfindung ein therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone oder eines oder mehrere dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

- Administrationform: oral
- Dosis 0.5 bis 200 mg für einen Menschen mit 70 kg Normalgewicht
- Verwendungszweck: Antitumor

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und experimentellen Daten näher erläutert.

### **Produktionsstamm**

Stamm So ce90 wurde im Juli 1985 an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi, im südlichen Afrika, isoliert. Der Stamm ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) unter Nr. 6773 hinterlegt.

**Stammkultur und morphologische Beschreibung:** Der Stamm wächst auf Cellulose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle mit  $\text{KNO}_3$  als einzige Stickstoffquelle, z.B. auf Filterpapier über ST21 Mineralsalzagar (0.1%  $\text{KNO}_3$ ; 0.1%  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ ; 0.1%  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ; 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.01%  $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ ; 0.02%  $\text{FeCl}_3$ ; 0.002% Hefeextrakt; Standard-Spurenelementlösung; 1% Agar). Auf diesem Medium werden dunkelrotbraune bis schwarzbraune Fruchtkörper gebildet, bestehend aus kleinen Sporangien (etwa 15 bis 30  $\mu\text{m}$  Durchmesser) in mehr oder weniger großen dichten Haufen und Paketen.

Der Stamm wächst sehr gut mit Glucose und  $\text{KNO}_3$ , z.B. auf CA2-Agar (Grundmedium: 1.5 g Agar in 92 ml Aqua dest.; Stammlösung 1: 7.5%  $\text{KNO}_3$ , 7.5%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in Aqua dest.; Stammlösung 2: 1.5%  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  in Aqua dest.; Stammlösung 3: 0.2%  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ , 0.15%  $\text{FeCl}_3$  in Aqua dest.; Stammlösung 4: 20% Glucose in Aqua dest. Die Stammlösungen werden durch Autoklavieren sterilisiert. Je 1 ml der Lösungen 1 bis 3, sowie 5 ml der Lösung 4 werden dem Grundmedium zugegeben, ebenso eine geeignete Menge einer Spurenelementlösung).

Die vegetativen Stäbchen haben die für *Sorangium* typische Form (relativ derbe, im Phasenkontrastmikroskop dunkle, zylindrische Stäbchen mit breit abgerundeten Enden, im Mittel 3 - 6 µm lang und 1 µm dick). Nach längerer Adaptation an das Wachstum in Flüssigmedien wächst der Stamm in homogener Zellsuspension.

Der Stamm So ce90 produziert chemisch nahe verwandte Verbindungen, die antibiotische Aktivität besitzen. Insbesondere sind diese Verbindungen cytotoxisch sowie antifungal wirksam. Hervorzuheben ist z.B. die Hemmung von *Mucor hiemalis*.

**Produktion der biologisch aktiven Verbindungen:**

Die Verbindungen werden während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert. Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l-Fermenter wird mit 60 l Medium (0.8% Stärke; 0.2% Glucose; 0.2% Soyamehl; 0.2% Hefeextrakt; 0.1%  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0.1%  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7.4) gefüllt. Beimpf wird mit 10 l einer im gleichen Medium jedoch zusätzlich mit 50 mM HEPES-Puffer pH 7.4 in Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (160 upm, 30 °C). Fermentiert wird bei 32 °C mit einer Rührgeschwindigkeit von 500 upm und einer Belüftung von 0.2 NL pro  $\text{m}^3$  und Std, der pH Wert wird durch Zugabe von KOH bei 7.4 gehalten. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage. Die gebildeten aktiven Verbindungen befinden sich teils im Überstand und teils in den Zellen.

Alternativ dazu kann in Gegenwart von Adsorberharzen (z.B. XAD-1180, Rohm und Haas, 2 - 5 %) fermentiert werden.

**Isolierung von Epothilon A und B**

Während der Fermentation von *Sorangium cellulosum* So ce90 (z.B. 70 l Fermentationsvolumen) in Gegenwart eines Adsorberharzes (z.B.: XAD-1180, Röhm und Haas, 2 % v/v) werden die gebildeten Antibiotika Epothilon A (Abb. 1) und B (Abb. 2) vollständig an das Harz gebunden. Nach Abtrennung der Kulturbrühe (z.B. durch Absieben in einem Prozeßfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewaschen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum bis auf den Wassergehalt eingedunstet und dreimal mit je 0.2 l Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatextrakte werden zur Trockne eingedunstet (ca. 40 g Trockengewicht).

Der Rohextrakt wird in 50 ml Methanol aufgenommen und an Lichroprep RP-18 25-40  $\mu\text{m}$  (Säule: 400 x 100 mm; Fluß: 200 ml/min; Merck Prepbar) isokratisch mit Methanol/Wasser 6/4 chromatographiert. Die Epothilone enthaltenden Fraktionen ( $R_f$  ca. 95 - 125 min) werden durch RP-18 Niederdruckchromatographie aufgereinigt. (Säule 400 x 60; HD-Sil-18-20-60, Labomatic; Laufmittel: Methanol/Wasser 65/35; Fluß 25 ml/min;  $R_f$  Epothilon A: 140 - 165 min;  $R_f$  Epothilon B: 170 - 195 min).

Die Feinreinigung der Epothilone erfolgt durch Kristallisation aus

1. Epothilon A: Toluol/Ethylacetat = 3 : 2
2. Epothilon B: Ethylacetat

### Epothilon A

$\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{NO}_6\text{S}$  [493]

FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für  $(\text{M} - \text{H})^-$

$^1\text{H}$ -NMR-Daten s. Tab. 1

$^{13}\text{C}$ -NMR-Daten s. Tab. 2

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)

IR Film auf Intran:

$\nu$ : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979  $\text{cm}^{-1}$

DC:  $R_F$  = 0,75

DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:

Dichlormethan/Methanol = 90 : 10

Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm

2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und Erhitzen auf 120 °C,  
braune Anfärbung

HPLC:  $R_f$  = 5,4 min

Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu\text{m}$ , Merck;

Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35

Detektor: UV 254 nm

**Epothilon B****C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>8</sub>S [507]****FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für (M - H)<sup>-</sup>****<sup>1</sup>H-NMR-Daten s. Tab. 1****<sup>13</sup>C-NMR-Daten s. Tab. 2****UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)****IR Film auf Intran:** **$\nu$  = 3400; 2958; 2931; 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm<sup>-1</sup>****DC: R<sub>F</sub> = 0,75****DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:****Dichlormethan/Methanol = 90 : 10****Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm****2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120 °C,  
braune Anfärbung****HPLC: R<sub>t</sub> = 8,3 min****Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu$ m, Merck:****Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35****Detektor: UV 254 nm**

Tabelle 1

<sup>1</sup> H-NMR-Daten der Epothilone A und B				
Atom	A		B	
2a	2,4	dd	2,22	dd
2b	2,52	dd	2,53	da
3	4,19	dd	4,24	dd
6	3,2	m	3,28	m
7	3,78	dd	3,75	dd
8	1,73	m	1,73	m
9a	1,4	m	1,4	m
9b	1,52	m	1,5	m
10a	1,4	m	1,4	m
10b	1,4	m	1,4	m
11a	1,42	m	1,42	m
11b	1,7	m	1,7	m
12	2,9	ddd	-	
13	3,01	ddd	2,8	dd
14a	1,85	ddd	1,9	ddd
14b	2,11	ddd	2,1	ddd
15	5,41	dd	5,41	dd
17	6,6	s	6,6	s
19	6,99	s	6,99	s
21	1,06	s	1,05	s
22	1,35	s	1,36	s
23	1,15	d	1,15	d
24	0,93	d	0,92	d
25	2,05	s	2,05	s
26	2,69	s	2,69	s
			1,28	s

\*) Zuordnung vertauschbar

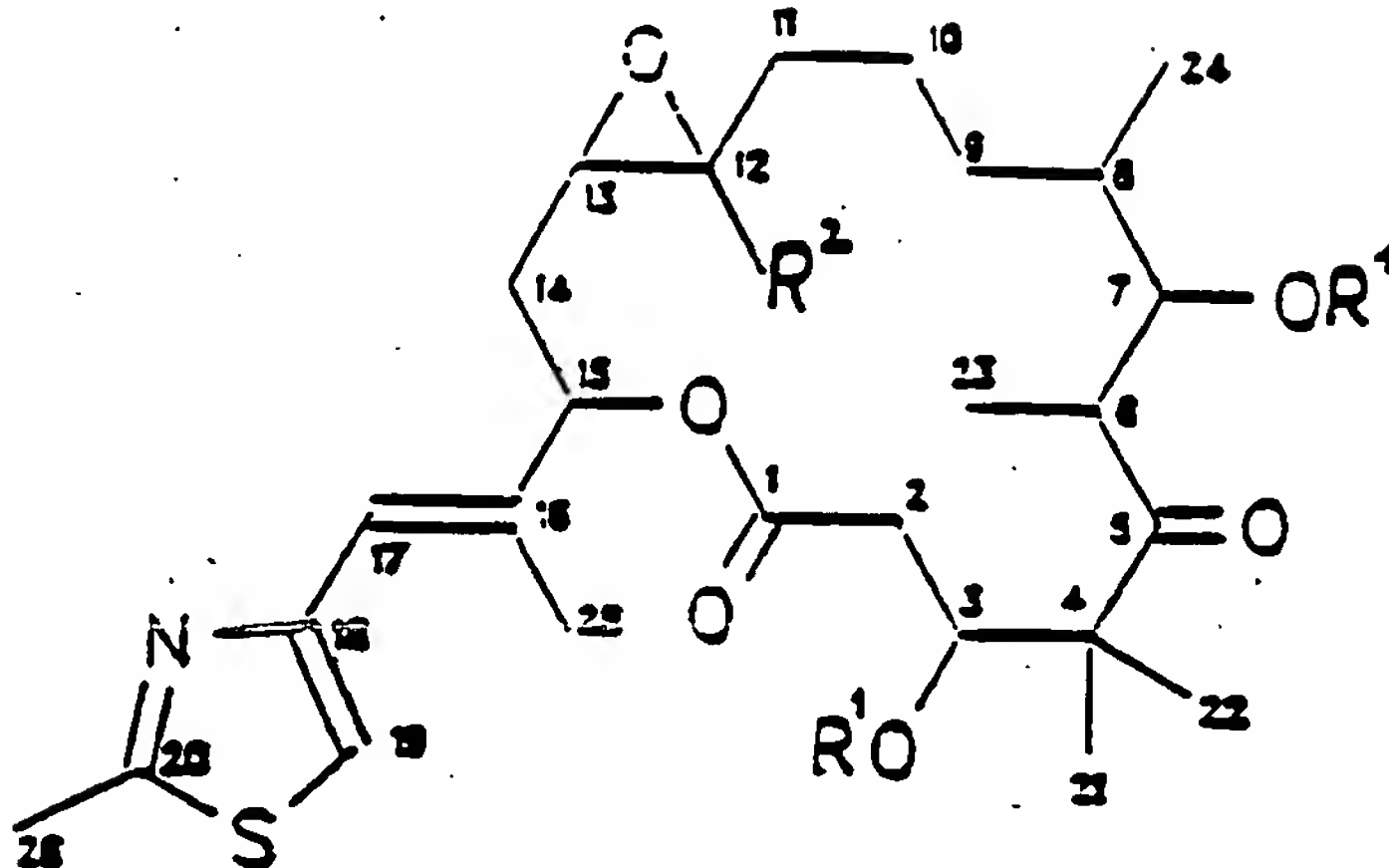
Tabelle 2

<sup>13</sup> C-NMR-Daten der Epothilone A und B		
Atom	A	B
1	170,5	170,5
2	39,1	39,4
3	73,2	72,9
4	53,0	53,2
5	219,9	219,8
6	43,5	43,1
7	74,7	74,3
8	36,4	36,6
9	30,7	30,9
10	23,6	22,5
11	27,6	32,3
12	57,4	61,3
13	54,6	61,7
14	31,7	32,4
15	76,8	76,9
16	137,4	137,5
17	120,1	120,0
18	152,1	152,1
19	116,3	116,2
20	165,0	165,1
21	20,4	19,7
22	21,6	21,5
23	14,1	13,7
24	17,1	17,1
25	15,6	15,7
26	19,1	19,0
27		22,7

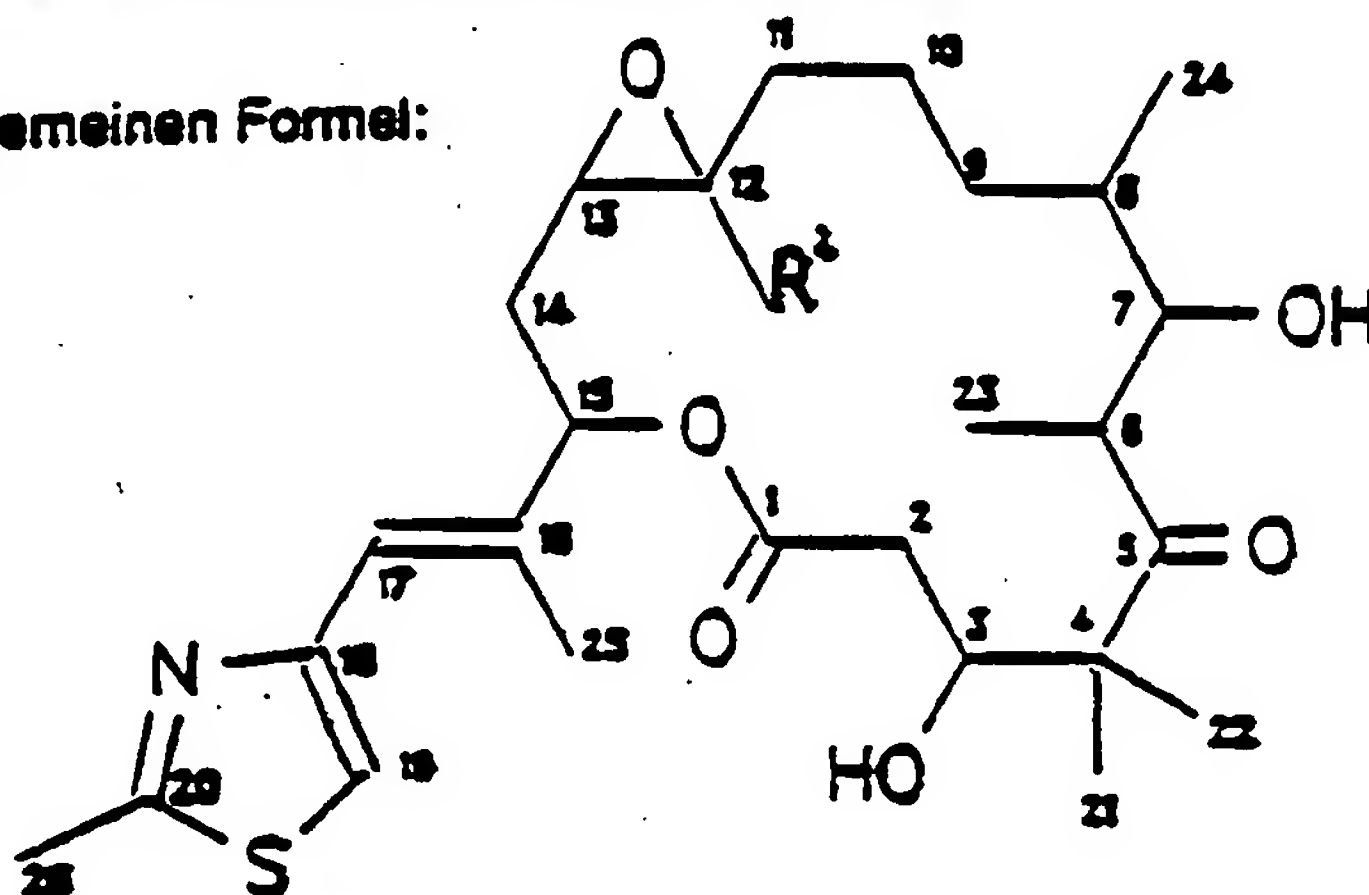
\*) Zuordnung vertauschbar

**Anwendungsbeispiel**

Nach bekannten Methoden (T. Meyer, U. Renegass, D. Fabbro, E. Alteri, J. Rösel, M. Müller, G. Caravatti & A. Matter: A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. Int. J. Cancer 1989, 43, 851-6) wird Epothilon A auf die Hemmung der T-24 Zelllinie untersucht. Es wird ein  $IC_{50}$  Wert von  $< 0.05 \mu M$  ermittelt.

**Patentansprüche****1. Epothilone der allgemeinen Formel:**

worin  $R^1$  Wasserstoff,  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl,  $C_1$ - $C_4$ -Acyl,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $1/2 Mg^{2+}$  oder  $1/2 Ca^{2+}$  bedeutet und  $R^2$  Wasserstoff oder eine Methylgruppe darstellt.

**2. Epothilone der allgemeinen Formel:**

worin  $R^2$  Wasserstoff oder Methyl ist.

**3. Epothilone, gekennzeichnet durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:**



<sup>1</sup> H-NMR-Daten			<sup>13</sup> C-NMR-Daten	
Atom			Atom	
2a	2,4	dd	1	170,5
2b	2,52	dd	2	39,1
3	4,19	dd	3	73,2
6	3,2	m	4	53,0
7	3,78	dd	5	219,9
8	1,73	m	6	43,5
9a	1,4	m	7	74,7
9b	1,52	m	8	36,4
10a	1,4	m	9	30,7
10b	1,4	m	10	23,6
11a	1,42	m	11	27,6
11b	1,7	m	12	57,4
12	2,9	ddd	13	54,6
13	3,01	ddd	14	31,7
14a	1,85	ddd	15	76,8
14b	2,11	ddd	16	137,4
15	5,41	dd	17	120,1
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,3
21*	1,08	s	20	165,0
22*	1,35	s	21*	20,4
23	1,15	d	22*	21,6
24	0,93	d	23	14,1
25	2,05	s	24	17,1
26	2,69	s	25	15,6
			26	19,1

\*) Zuordnung vertauschbar

**C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub>S [493]**

**FAB-MS (neg. Ionen): 492.25 für (M - H)<sup>-</sup>**

**UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)**

**IR Film auf Intran:**

**$\nu$ : 3429; 2966; 2937; 1737; 1691; 1463; 1374; 1295; 1257; 1185; 1150; 1087; 1029; 1014; 979 cm<sup>-1</sup>**

**DC: R<sub>F</sub> = 0,75**

**DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:**

**Dichlormethan/Methanol = 90 : 10**

**Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm**

**2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzen auf 120 °C,  
braune Anfärbung**

**HPLC: R<sub>t</sub> = 5,4 min**

**Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu$ m, Merck**

**Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35**

**Detektor: UV 254 nm**

**4. Epothilon, *gekennzeichnet* durch einen oder mehrere der folgenden Parameter:**

<sup>1</sup> H-NMR-Daten			<sup>13</sup> C-NMR-Daten	
Atom			Atom	
2a	2,22	dd	1	170,5
2b	2,53	dd	2	39,4
3	4,24	dd	3	72,9
6	3,28	m	4	53,2
7	3,75	dd	5	219,8
8	1,73	m	6	43,1
9a	1,4	m	7	74,3
9b	1,5	m	8	36,6
10a	1,4	m	9	30,9
10b	1,4	m	10	22,5
11a	1,42	m	11	32,3
11b	1,7	m	12	61,3
12	-		13	61,7
13	2,8	dd	14	32,4
14a	1,9	ddd	15	76,9
14b	2,1	ddd	16	137,5
15	5,41	dd	17	120,0
17	6,6	s	18	152,1
19	6,99	s	19	116,2
21*	1,05	s	20	165,1
22*	1,36	s	21*	19,7
23	1,15	d	22*	21,5
24	0,92	d	23	13,7
25	2,05	s	24	17,1
26	2,69	s	25	15,7
27	1,28	s	26	19,0
			27	22,7 (R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> )

\*) Zuordnung vertauschbar

**C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>6</sub>S [507]**

**FAB-MS (neg. Ionen): 506.25 für (M - H)<sup>-</sup>**

**UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) = 210 (4.17); 249 (3.97)**

**IR Film auf Intran:**

**$\nu$  = 3400; 2958; 2931, 2875; 1735; 1689; 1629; 1609; 1463; 1378; 1250; 1149; 1049; 977 cm<sup>-1</sup>**

**DC: R<sub>F</sub> = 0,75**

**DC-Alufolie 60 F<sub>254</sub>, Merck; Laufmittel:**

**Dichlormethan/Methanol = 90 : 10**

**Detektion: 1. UV-Löschung bei 254 nm**

**2. Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und erhitzt auf 120 °C,  
braune Anfärbung**

**HPLC: R<sub>t</sub> = 6,3 min**

**Säule: 4 x 250 mm Lichrosorb RP-18 7  $\mu$ m, Merck;**

**Fluß: 1,5 ml/min; Laufmittel: Methanol/Wasser = 65 : 35**

**Detektor: UV 254 nm**

**5. Verfahren zum Herstellen von Epothilonen nach einem der vor anstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man den Stamm So ce90**

- in einem Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und Mineralsalze enthaltenden Medium kultiviert,
- entweder während der Kultivierung des Stammes oder anschließend ein Adsorbentharz zusetzt,
- die Fermenterbrühe abtrennt,
- die Epothilone aus dem Adsorbentharz eluiert und
- die Eluate direkt oder über weitere Reinigungsschritte von dem/den Lösungsmittel(n) befreit,
- und gegebenenfalls über Hochdruck/Niederdruckchromatographie und/oder Umkristallisation die verschiedenen Epothilone aufreinholt und voneinander trennt.

**6. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen gemäß einem der voranstehenden Ansprüche oder eines oder mehrerer dieser Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).**

**7. Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Fungizid oder Fungistatikum ist.**

**8. Therapeutisches Mittel, das insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken kann, bestehend aus einem oder mehreren Epothilonen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder diese Epothilone enthaltend, gegebenenfalls neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/02656

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5 C07D 493/04; C12P 17/18; A01N 43/90; A61K 31/425  
/(C07D493/04,313:00,303:00)(C12P17/18,C12R1:00)  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5 C07D; C12P; A01N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, No. 7, 18 August 1980, Columbus, Ohio, US; abstract No. 72218v, Y. SHIMAUCHI ET AL. 'Deltamycin antibiotics' page 1025; see abstract & JP, A, 54 038 113 (SANRAKU-OCEAN CO.) 19 November 1979, compound with CN: 74226-44-1 -----	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understate the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 February 1993 (11.02.93)

Date of mailing of the international search report  
25 February 1993 (25.02.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

<b>I. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> (bei mehreren Klassifizierungssymbolen sind alle anzugeben) <sup>1</sup>		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 5 C07D493/04; C12P17/18; A01N43/90; A61K31/425 //(C07D493/04, 313:00, 303:00)(C12P17/18, C12R1:00)		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEGENSTÄNDE</b>		
Recherchierte Klassifizierung <sup>2</sup>		
Klassifizierungssymbol	Klassifizierungssymbole	
Int.Kl. 5	C07D ; C12P ; A01N ; A61K	
Recherchierte nicht zum Klassifizierungssymbol gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>3</sup>		
<b>III. KINERKLÄRUNG VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>4</sup></b>		
Art <sup>5</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der wesentlichen Teile <sup>12</sup>	Bez. Anspruch No. <sup>13</sup>
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, no. 7, 18. August 1980, Columbus, Ohio, US; abstract no. 72218v, Y: SHIMAUCHI ET AL. 'Deltacycin antibiotics' Seite 1025 ; siehe Zusammenfassung & JP,A,54 038 113 (SANRAKU-OCEAN CO.) 19. November 1979 Verbindung mit CN: 74226-44-1	1
<p><sup>1</sup> Besondere Kategorie von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p><sup>A</sup> Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik bildet, aber nicht als bestimmtes Dokument erschienen ist</p> <p><sup>B</sup> Wenn Dokument, das jedoch erst zu oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p><sup>C</sup> Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch nachweislich anzudeuten zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungssymbol oder andere im Recherchebericht genannte Veröffentlichung bekannt wird oder die auf einem anderen besonderen Grund angegeben ist (z.B. exemplarisch)</p> <p><sup>D</sup> Veröffentlichung, die sich auf eine schriftliche Offenbarung, eine Erfindung, eine Anwendung oder andere Informationen bezieht</p> <p><sup>E</sup> Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem entsprechenden Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p><sup>F</sup> Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p><sup>G</sup> Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfindungsfähiger Tätigkeit basierend betrachtet werden</p> <p><sup>H</sup> Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsfähiger Tätigkeit basierend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann einleuchtend ist</p> <p><sup>I</sup> Veröffentlichung, die Mängel des internationalen Prioritätsdatums ist</p>		
<b>IV. BEZUGSANGABEN</b>		
Datum der Abnahme der internationalen Recherche		Abnahme des internationalen Rechercheberichts
11. FEBRUAR 1993		25. 02. 93
Internationale Recherchebehörde		Unterschrift des beauftragten Beamten
EUROPÄISCHES PATENTAMT		VOYIAZDOLOU D.

trialkylsilyl, or benzyl or phenyl (both optionally substituted by 1-6C alkoxy, 6C alkyl, OH and halo).

USE - The compounds are used in plant protectants for agriculture, horticulture and forestry, and in pharmaceuticals, especially as cytostatics (claimed). They are derived from epothilone A and B, and have cytotoxic and immunosuppressant activity.

Dwg.0/0

Title Terms: NEW; DERIVATIVE; USEFUL; CYTOSTATIC; PLANT; PROTECT; AGENT; EPOXY; DI; HYDROXY; TETRA; METHYL; OXO; ACID; LACTONE; DERIVATIVE

Index Terms/Additional Words: THIAZOLYL

Derwent Class: B02; B03; C02

International Patent Class (Main): C07D-493/08

International Patent Class (Additional): A01N-043/90; A61K-031/425;

C07D-417/06; C07D-493/18; C07D-497/08; C07F-007/07; C07F-009/655

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B06-A02; C06-A02; B07-A03; C07-A03; B07-F01;

C07-F01

Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* B614 B711 B712 B720 B743 B744 B831 B832 F012 F014 F015 F016 F017

Ellipsed...

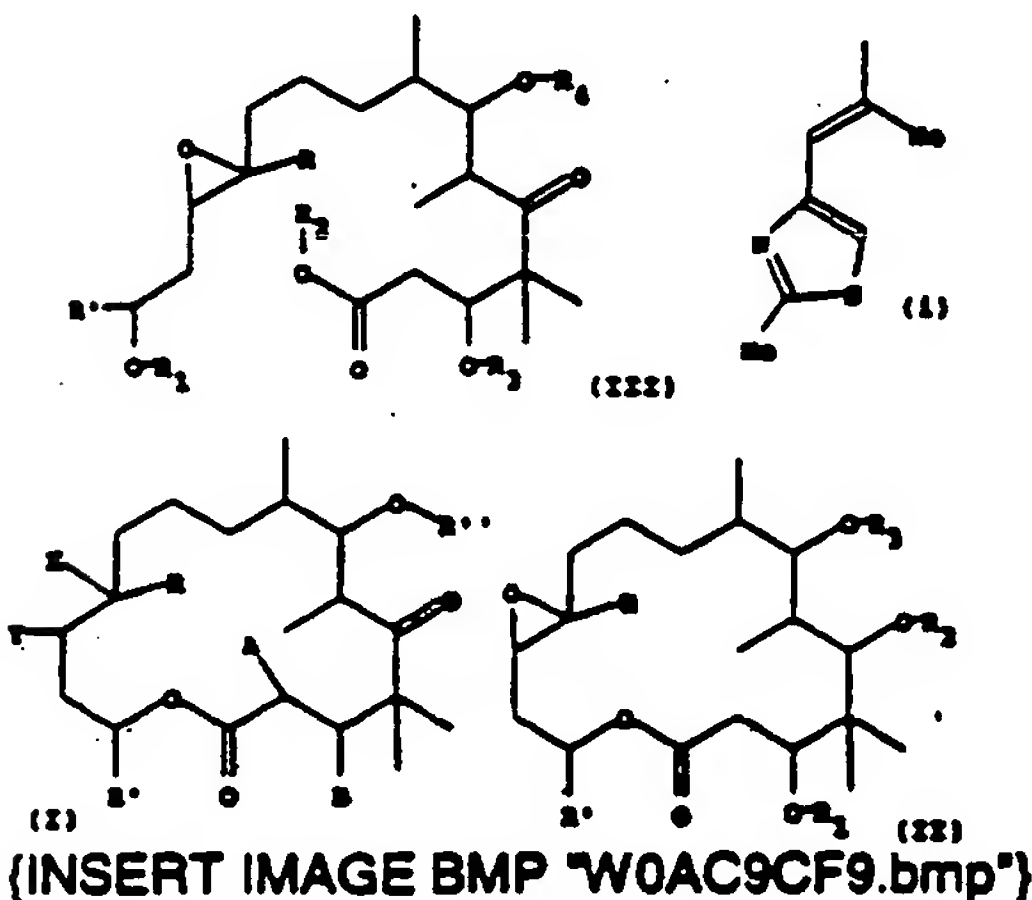
M710 M903 M904 P002 P340 P431 P633 9727-00407-N 00561 40014 76869

76870 76871 00012

Ring Index Numbers: 00561; 40014; 76869; 76870; 76871; 00012

Generic Compound Numbers: 9727-00401-N; 9727-00402-N; 9727-00403-N;

9727-00404-N; 9727-00405-N; 9727-00406-N; 9727-00407-N



9/19/14

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI

(c)1999 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

W0 9 3 10 12 1

009482834 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 93-176369/199322

XRAM Acc No: C93-078740

Epithilone derivs. obtd. by cultivating sorangium cellulosum - are fungicides and fungistatic(s) for plant protection and pharmaceuticals with cyto-toxic and immunosuppressive activity

Patent Assignee: CIBA GEIGY AG (CIBA ); GBF GES BIOTECH FORSCHUNG GMBH (GBFB )



Inventor: BEDORF N; GERTH K; HOFLE G; REICHENBACH H; HOEFLE G

Number of Countries: 023 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
DE 4138042	A1	19930527	DE 4138042	A	19911119	C07D-493/04	199322 B
WO 9310121	A1	19930527	WO 92EP2656	A	19921119	C07D-493/04	199322
AU 9229437	A	19930615	AU 9229437	A	19921119	C07D-493/04	199340
DE 4138042	C2	19931014	DE 4138042	A	19911119	C07D-493/04	199341

Priority Applications (No Type Date): DE 4138042 A 19911119

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; JP 54038113

Patent Details:

Patent Kind Lan Pg Filing Notes Application Patent

DE 4138042 A1 10

WO 9310121 A1 G 23

Designated States (National): AU CA FI HU JP KR NO US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL SE

AU 9229437 A Based on

WO 9310121

DE 4138042 C2 10

Abstract (Basic): DE 4138042 A

Epothilone derivs. of formula (I) are new. In (I) R1 = H, 1-4C alkyl, 1-4C acyl, Li+, K+, Na+, 1/2Mg2+, or 1/2Ca2+; R2 = H or Me.

(I) can be prepd. by (a) cultivating sorangium cellulosum strain So ce 90 in a medium contg. C and N source and mineral salts; (b) adding an adsorber resin either during or after cultivation; (c) sepg. the fermenter broth; (d) eluting the (I) from the adsorber resin; and (e) removing solvent(s) from the eluate immediately or after further purificn. steps; and opt. (f) purifying and separating the various cpds. (I) by high pressure/low pressure chromatography and/or recrystallisation.

USE/ADVANTAGE - (I) can be used as plant protecting agents in agriculture, forestry and/or horticulture, esp. as fungicides or fungistatics. (I) can also be used as therapeutic agents which esp. have cytotoxic activity and/or immunosuppressive activity. No further details of the activity given.

ber

Dwg.0/0

Abstract (Equivalent): DE 4138042 C

Epothilone cpds. of formula (I) are new. R1 is H, 1-4C alkyl, 1-4C acyl, Li, K, Na, 1/2 Mg or 1/2 Ca; and R2 is H or CH3. Two epothilones, with specified NMR spectra (1H and 13C), IR spectrum etc.; and empirical formulae C26H39NO6S (493) and C27H41NO6S (507) are specifically claimed.

(I) are prepd. by culturing strain So ce 90 in a medium contg. a source of C and N, and minerals; adding adsorbent resin; removing the ferment broght, eluting (I) from the resin removing solvent; etc.; and purifying and separating the (I) by HP/LP chromatography and/or recrystallisation.

USE/ADVANTAGE - (I) are plant-protective agents and therapeutics with cytotoxic and immunosuppressive properties (claimed).

Dwg.0/0

Title Terms: DERIVATIVE; OBTAIN; CULTIVATE; SORANGIUM; CELLULOSUM; FUNGICIDE; FUNGICIDE; PLANT; PROTECT; PHARMACEUTICAL; CYTO; TOXIC; IMMUNOSUPPRESSIVE; ACTIVE

Derwent Class: B02; C02; D16

International Patent Class (Main): C07D-493/04

International Patent Class (Additional): A01N-043/90; A01N-063/02;

A61K-031/425; C07G-011/00; C12P-017/18; C07D-303-00; C07D-313-00;  
C07D-493/04; C12R-001-00

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B06-A03; C06-A03; B12-A02C; C12-A02C; B12-D02B;  
C12-D02B; D05-C

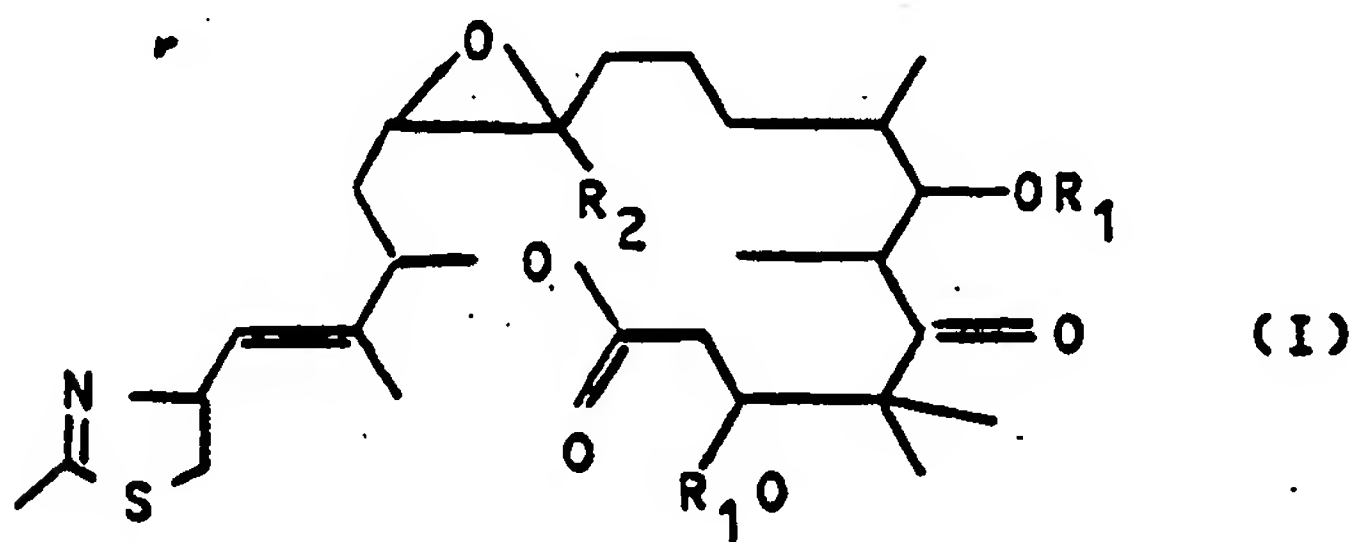
Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* D015 D016 D030 D160 F012 F014 F710 H401 H402 H421 H422 H521 H522 H7  
H721 J5 J522 L472 L499 L9 L942 M1 M126 M133 M210 M211 M212 M213 M214  
M215 M216 M231 M232 M233 M240 M272 M281 M282 M283 M313 M321 M331  
M342 M412 M511 M521 M530 M540 M710 M903 M904 P001 P241 P433 P633  
Q233 9322-02501-N 40014

Ring Index Numbers: 40014

Generic Compound Numbers: 9322-02501-N

{INSERT IMAGE BMP "W090B252.bmp"}



50.degree. and the reaction mixt. was adjusted to pH 7 with 1 M phosphate buffer to give 2 isomers, each in 19% yield.

L4 ANSWER 14 OF 15 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS  
ACCESSION NUMBER: 1997:443365 CAPLUS  
DOCUMENT NUMBER: 127:81289  
TITLE: Preparation of epothilone derivatives as agrochemicals and pharmaceuticals  
INVENTOR(S): Hofle, Gerhard; Kiffe, Michael  
PATENT ASSIGNEE(S): Gesellschaft Fur Biotechnologische Forschung Mbh (Gbf), Germany; Hofle, Gerhard; Kiffe, Michael  
SOURCE: PCT Int. Appl., 38 pp.  
DOCUMENT TYPE: CODEN: PIXXD2  
LANGUAGE: Patent  
FAMILY ACC. NUM. COUNT: 2 German  
PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
WO 9719086	A1	19970529	WO 96-EP5080	19961118
W: JP, US				
RW: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE				
DE 19542986	A1	19970522	DE 95-19542986	19951117
DE 19639456	A1	19980326	DE 96-19639456	19960925
EP 873341	A1	19981028	EP 96-939097	19961118
R: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE, MC, PT, IE, FI				

PRIORITY APPLN. INFO.:

DE 95-19542986	19951117
DE 96-19639456	19960925
WO 96-EP5080	19961118

OTHER SOURCE(S):

MARPAT 127:81289

AB The title compds., e.g., I [R = H, C1-4 alkyl; R1, R2 = H, C1-6 alkyl, C1-6 acyl, benzoyl, C1-4 trialkylsilyl, benzyl, Ph, C1-6 alkoxy, C6 alkyl-, hydroxy-, and halo-substituted benzyl or phenyl; X, Y = H, halo, pseudohalo, OH, acyloxy, alkoxy, benzoyloxy; or YZ = O, bond; however, I may not be epothilone A or B], useful as agrochems. and pharmaceuticals (no data), are prepd. Thus, epothilone A in acetone contg. trifluoroacetic acid was heated overnight at 50.degree. and the reaction mixt. was adjusted to pH 7 with 1 M phosphate buffer to give 2 isomers, each in 19% yield.

L4 ANSWER 15 OF 15 CAPLUS COPYRIGHT 1999 ACS  
ACCESSION NUMBER: 1994:52841 CAPLUS  
DOCUMENT NUMBER: 120:52841  
TITLE: Epothilone derivatives  
INVENTOR(S): Hoefle, Gerhard; Bedorf, Norbert; Gerth, Klaus;  
PATENT ASSIGNEE(S): Reichenbach, Hans  
SOURCE: Gesellschaft fuer Biotechnologische Forschung mbH (GBF), Germany  
DOCUMENT TYPE: Ger. Offen., 10 pp.  
LANGUAGE: CODEN: GWXXBX  
FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1 Patent  
PATENT INFORMATION: German

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
DE 4138042	A1	19930527	DE 91-4138042	19911119
DE 4138042	C2	19931014		
WO 9310121	A1	19930527	WO 92-EP2656	19921119
W: AU, CA, FI, HU, JP, KR, NO, US				
RW: AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE				
AU 9229437	A1	19930615	AU 92-29437	19921119
PRIORITY APPLN. INFO.:				
DE 91-4138042 19911119				
WO 92-EP2656 19921119				

OTHER SOURCE(S):

AB Fungicidal antibiotic epothilones I (R1 = H, alkyl, acyl, Li, etc.; R2 = H, Me) and a fermentative process for their prepn. are claimed. The process for their prepn. comprises the fermn. of Sorangium cellulosum in the presence of a resin. During the fermn. epothilone A (R1 = R2 = H) and epothilone B (R1 = H, R2 = Me) are bound to the resin. Agrochem. fungicides contg. epothilone A and epothilone B

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**